

## 急性病毒性坏死病毒引物酶表达及酶学活性分析

钱 璟<sup>1,2</sup>, 王崇明<sup>2\*</sup>, 潘鲁青<sup>1</sup>, 黄 健<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院,海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,山东 青岛 266071)

**摘要:** 根据急性病毒性坏死病毒(acute viral necrosis virus, AVNV) ORF 024 序列设计引物,以 AVNV 的 DNA 为模板进行扩增 AVNV 引物酶(primase)基因,同时构建表达质粒 pET32a-prim,并转化至 *E. coli* BL21(DE3)进行诱导表达。SDS-PAGE 检测显示诱导表达两条蛋白条带,其中分子量为 60 ku 的蛋白条带与预期表达蛋白条带大小一致,另一蛋白条带分子量约为 55 ku,经 Western-blotting 及质谱分析鉴定分子量 60 ku 的蛋白条带为 AVNV-引物酶,而表达出的 55 ku 蛋白条带存在部分引物酶多肽片段。RNA 结合荧光染料 Pico-Green 在 30 min 内荧光强度比较稳定,从而确定 30 min 为进行 AVNV 引物酶活性分析的最佳终止反应时间,并在引物合成实验中观察到 30 min 内引物酶活性较高。当使用多聚胞嘧啶寡核苷酸 poly(d C) 为模板时,重组引物酶能特异性催化底物 GTP。0.1 mmol/L Zn<sup>2+</sup> 可显著增强引物酶活性,而 1 mmol/L Mn<sup>2+</sup> 和 EDTA 能抑制引物酶活性。

**关键词:** 引物酶; 原核表达; Pico-Green 核酸染料; 酶学活性; 多聚胞嘧啶寡核苷酸

**中图分类号:** Q 939.4; S 943

**文献标志码:** A

急性病毒性坏死病毒(acute viral necrosis virus, AVNV)是导致山东半岛、辽东半岛沿海养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)大规模死亡的病原,为双链 DNA 病毒且呈球形,主要存在于扇贝外套膜、消化腺、肠和肾脏细胞间质和结缔组织细胞中<sup>[1-5]</sup>。根据任伟成等<sup>[6]</sup>的测序结果,在 AVNV 全基因组预测的开放阅读框(open reading frames, ORF)中,发现与 AVNV 的 DNA 复制、核酸修饰与代谢及病毒与宿主相互作用相关的 ORF 有 44 个。其中 ORF 024 编码的引物酶基因参与病毒 DNA 复制。

在 DNA 复制过程中,引物酶为依赖单链 DNA 的 RNA 聚合酶,而多聚胞嘧啶寡核苷酸 poly(d C) 和多聚胸腺嘧啶寡核苷酸 poly(d T) 就可作为单链 DNA 模板,并特异性结合引物酶活性位点发挥作用<sup>[7-8]</sup>。所有生物体的 DNA 聚合酶进行合成时必须要有 3'-OH 的多核苷酸引物

(primer)存在,才能将添加的核苷酸连接到羟基上,生物体存在 3 种方式解决这个问题。其中最普遍的机制是在生物体引物酶催化下,以单链 DNA 为模板合成小段 RNA 引物为聚合酶提供合成 DNA 的 3'-OH。所有真核生物、细菌和许多病毒都是按这一策略解决 DNA 合成的起始问题<sup>[9-10]</sup>。目前研究的引物酶大致分为 3 类,(1)原核表达的引物酶,与解旋酶结合<sup>[11]</sup>;(2)真核表达的引物酶,与多聚酶结合;(3)非细胞结构的引物酶。

病毒的复制与引物酶活性密切相关。Harrington 等<sup>[7]</sup>发现肿瘤细胞中的 DNA 复制比正常细胞的活跃,同时肿瘤细胞中引物酶活性明显高于正常细胞。赵琪<sup>[12]</sup>发现 SARS 引物酶是由 nsp7 和 nsp8 形成的筒状十六聚体复合物,它在 SARS 复制和转录过程具有重要作用。朱孝峰等<sup>[13]</sup>在进行肿瘤发生及治疗作用的相关研究中

收稿日期:2012-12-26 修回日期:2013-04-22

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)

通信作者:王崇明,E-mail:wangcm@ysfri.ac.cn

发现从艾氏腹水癌中提取的 DNA 引物酶在增殖的肿瘤细胞中具有显著活性。蒋培余<sup>[14]</sup>发现在肿瘤细胞 DNA 复制中,引物酶能够引发复制功能,因此推测此引物酶可作为控制肿瘤发生与增殖的理想靶点。虽然目前大肠杆菌引物酶、多种哺乳动物与其病毒引物酶已被广泛研究,但在贝类病毒以至水生动物病毒研究方面,均尚未发现类似的研究报道,因此利用分子生物学手段对 AVNV 引物酶的结构和功能开展探索性研究,以期了解 AVNV 的致病机理、AVNV 病原与宿主之间的相互作用关系,从而为防控 AVNV 的流行和传播提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

表达载体 pET-32a(+)由本实验室保存;DH5a 菌株、BL21(DE3)为 TIANGEN 公司产品;限制性内切酶(*Bam* H I 和 *Hind* III)、*T*<sub>4</sub> 连接酶、*Ex* *Taq* 酶分别购自 MBI 公司、全式金公司(北京)和宝生物公司(大连);ATP、GTP、UTP 和 CTP 均为宝生物公司产品;蛋白定量测定试剂盒购置 TIANGEN 公司;Pico-Green 核酸荧光染料试剂盒购自 Invitrogen 公司;Co<sup>2+</sup> 琼脂糖凝胶纯化柱为 Clontech 公司产品;胶回收及质粒提取试剂盒均为 ZYMO RESEARCH 公司产品;PCR 引物合成、多聚寡核苷酸 poly(d C)、DNA 测序和蛋白质谱分析均由上海生工生物有限公司完成;其他试剂和耗材均为国产。

### 1.2 AVNV 粗提液的制备与总 DNA 提取

取 2009 年 8 月采自青岛沙子口养殖海区具有典型发病症状的栉孔扇贝冻存样品,将扇贝组织放于冰上用海水反复冲洗解冻,加 10 倍体积除菌海水后,用高速匀浆机 20 000 r/min 匀浆 4~5 次,每次 1 min;将匀浆液以 1 000 × g 于 4 °C 离心 20 min,弃沉淀,将上清液 2 500 × g 于 4 °C 离心 1 h,弃沉淀,将其上清液 7 500 × g 于 4 °C 离心 30 min,取上清液即为 AVNV 粗提液,−80 °C 保存备用。

AVNV 病毒粗提液总 DNA 提取按照 TIANamp 海洋动物 DNA 提取试剂盒(天根公司)说明书要求方法进行。

### 1.3 PCR 引物设计、AVNV-引物酶基因的克隆及重组表达载体的构建

根据本实验室测定完成的 AVNV 基因组序

列中 ORF 024 序列,运用 Primer Premier 5.0 设计上、下游引物 F<sub>1</sub>: 5'-GGA TCCATG ATA AGC AAG CAA AAC C-3',其中划线部分为添加的 *Bam* H I 酶切位点,下游引物 R<sub>1</sub>: 5'-AAG CTTGGA ACA GCC CTT CAA AGG AC-3',划线部分为添加的 *Hind* III 酶切位点。

以提取的病毒 DNA 为模板,PCR 反应体系(25 μL):10 × Buffer(2.5 μL),dNTP(2.5 mmol/L,2.0 μL),F1(10 μmol/L,1.0 μL),R1(10 μmol/L,0.5 μL),总 DNA(2.0 μL,0.2 μg/μL),*Ex* *Taq*(0.2 μL,5 U/μL),ddH<sub>2</sub>O(16.8 μL)。

PCR 反应条件:94 °C 预变性 4 min,94 °C 35 s,47 °C 35 s,72 °C 35 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物扩增结果。将扩增出约 1 050 bp 的 PCR 产物切胶回收并连接至 pEasy-T1 载体中,做 TA 克隆并测序。TA 克隆质粒经限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切后回收目的片段,与经过 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切的原核表达载体 pET-32a(+)连接,并转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中并提取质粒酶切鉴定。鉴定正确重组表达载体命名为 pET32a-prim。

### 1.4 重组蛋白的诱导表达及纯化

将 pET32a-prim 质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,接种于含氨苄青霉素(Amp,100 μg/mL)LB 培养基,37 °C 培养过夜,次日按 1:100 接种到新鲜 LB 培养液(含氨苄青霉素 100 μg/mL)中,待培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6 左右时,取 2 mL 另行培养(未诱导),其余菌液加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 °C 诱导 5~6 h,收集菌液离心后弃上清液,于沉淀中加入裂解缓冲液冰浴中快速超声破碎,10 000 × g 离心 5 min,上清液及沉淀分别取样加入 SDS 上样缓冲液,90 °C 煮沸变性 5 min,12% SDS-PAGE 观察蛋白表达情况。

按 Co<sup>2+</sup> 亲和层析说明书(Clontech 公司)进行重组引物酶的纯化。先将超声裂解菌液 10 000 × g 于 4 °C 离心 5 min,弃上清液;加入洗涤缓冲液(Tris-HCl pH 8.0,50 mmol/L;EDTA 1 mmol/L;NaCl 50 mmol/L;尿素 2 mol/L;Triton X-100 0.5%)轻柔吹打充分洗涤菌液,10 000 × g,4 °C 离心 1 min,弃上清液,重复 3 次,最后再用纯水反复洗涤 3 次,去除洗涤缓冲液;加 A 液(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.2 mol/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 mol/L; 盐酸胍 6 mol/L;  $\text{NaCl}$  0.3 mol/L; pH 7.0) 溶解,  $10\ 000 \times g$  于 4 °C 离心 1 min, 收集上清液并用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤; 用 A 液洗柱,  $\text{OD}_{280}$  为 0, 加溶解于 A 液的重组蛋白, 再用 A 液洗柱,  $\text{OD}_{280}$  为 0; 再加入 C 液 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 mol/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 mol/L; 盐酸胍 5.4 mol/L;  $\text{NaCl}$  0.27 mol/L; 咪唑 0.15 mol/L; pH 7.0), 当吸收值升高时开始收集, 收集至吸收值不再变化, 收集液中含纯化重组蛋白。

### 1.5 重组蛋白包涵体的复性

将纯化蛋白先在透析复性缓冲液 I ( $\text{NaCl}$  50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 4 mol/L; 甘氨酸 1%;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mmol/L, pH 7.4) 中透析 12 h, 然后转移至透析复性缓冲液 II ( $\text{NaCl}$  50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 2 mol/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mmol/L, pH 7.4) 中透析 12 h, 再在透析复性缓冲液 III ( $\text{NaCl}$  50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 尿素 1 mol/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mmol/L, pH 7.4) 中透析 12 h, 最后在 PBS ( $\text{NaCl}$  16g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.8 g/L,  $\text{KCl}$  0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4 g/L) 中透析复性 12 h, 超滤离心,  $5\ 600 \times g$ , 20 min。将浓缩后重组蛋白 -20 °C 保存备用。

### 1.6 重组引物酶的鉴定、含量测定

用 Bradford 蛋白质测定试剂盒 (天根公司) 测定纯化的重组引物酶的蛋白含量。

将纯化的重组引物酶进行 12% SDS-PAGE, 用 6  $\times$  His 标签的抗体进行 Western-blotting 验证并将重组蛋白进行质谱分析。

### 1.7 重组引物酶酶学活性分析

Pico-Green 染料荧光强度稳定性的检测  
反应体系 (3 份平行实验, 每份反应体系为 200  $\mu\text{L}$ ) 为 50 mmol/L Hepes, 100 mmol/L 谷氨酸钾 (pH 7.5), 10 mmol/L DTT, 10 mmol/L 乙酸镁, 200  $\mu\text{mol/L}$  GTP, 200 nmol/L poly(d C), 不加入重组引物酶, 用 nuclease-free water 补齐, 加入新鲜配制的 Pico-Green 荧光染料混合溶液 25  $\mu\text{L}$  (Pico-Green 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $1 \times$  TE 缓冲液 22.5  $\mu\text{L}$ ), 按 10、20、30、40、50 和 60 min 共 6 个时间点用 96 孔荧光光度计检测激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 538 nm 时的荧光强度数值。

引物酶活性的测定 反应体系同 Pico-Green 染料荧光强度稳定性的检测, 先将纯化的

重组引物酶在 30 °C 浴预热 5 min, 设置 (加入 5  $\mu\text{L}$  引物酶) 10、20、30、40、50 和 60 min 共 6 个时间点的实验组, 每组 3 个平行, 同时每个实验组都设置未加入引物酶的阴性对照用于消除反应体系自身背景值。30 °C 孵育进行反应。

在反应 10、20、30、40、50 和 60 min 时分别向各实验组中加入新鲜配制的 Pico-Green 荧光染料混合溶液 25  $\mu\text{L}$  (Pico-Green 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $1 \times$  TE 缓冲液 22.5  $\mu\text{L}$ ), 按 10、20、30、40、50 和 60 min 共 6 个时间点用 96 孔荧光光度计检测激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 538 nm 时的荧光强度数值。

重组引物酶底物特异性实验 将纯化重组的引物酶和核糖核苷三磷酸底物 (ATP、GTP、CTP 或 UTP 之一) 分别于 30 °C 预热 5 min, 加入到 200  $\mu\text{L}$  反应体系中, 使反应体系含 50 mmol/L Hepes, 100 mmol/L 谷氨酸钾, 10 mmol/L DTT, 10 mmol/L 乙酸镁 (pH 7.5), 同时设置相应的只加入引物酶或不同组合的底物作为阴性对照组, 30 °C 孵育 30 min, 检测步骤同引物酶活性的测定。

不同浓度 EDTA 对重组引物酶活性的影响  
反应体系同 Pico-Green 染料荧光强度稳定性的检测。将纯化的重组引物酶 30 °C 预热 5 min, 在反应体系中加入 5  $\mu\text{L}$  引物酶和不同浓度的 EDTA (0、1、5 和 10 mmol/L) 溶液的组的实验组, 同时设置相应的只加入不同浓度的 EDTA 的阴性对照, 30 °C 孵育 30 min, 检测步骤同引物酶活性的测定。

不同金属离子对重组引物酶活性的影响  
反应体系同 Pico-Green 染料荧光强度稳定性的检测。将纯化的重组引物酶 30 °C 预热 5 min, 在反应体系中加入 5  $\mu\text{L}$  引物酶的同时, 额外加入不同浓度  $\text{Na}^+$  (5 mmol/L)、 $\text{K}^+$  (1 mmol/L)、 $\text{Mg}^{2+}$  (1 mmol/L)、 $\text{Mn}^{2+}$  (1 mmol/L)、 $\text{Zn}^{2+}$  (0.1 mmol/L) 和正常反应体系共 6 个实验组, 同时设置相应的不加酶的阴性对照。30 °C 孵育 30 min, 检测步骤同引物酶活性的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 AVNV-引物酶基因 PCR 扩增及鉴定

以提取 AVNV 粗提液总 DNA 为模板, PCR 扩增得到约 1 050 bp 大小的片段, 与预期大小一致 (图 1)。TA 克隆并进行测序, 证实扩增条带为目的基因条带。

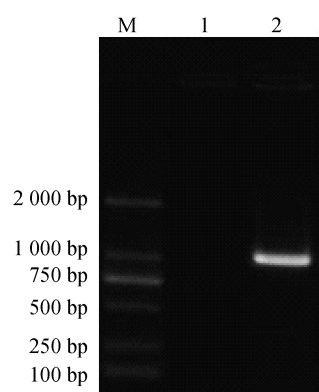


图1 AVNV-引物酶基因编码框的 PCR 扩增

M. DNA marker; 1. 空白对照; 2. PCR 产物。

Fig.1 PCR amplification product of the AVNV-primase open reading frame(ORF)

M. DNA marker; 1. control; 2. PCR products.

## 2.2 重组引物酶的诱导表达及鉴定

将经 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切、测序验证正确重组质粒 pET32a-prim 转化至表达菌株 BL21(DE3) 中, IPTG 诱导重组蛋白表达, 经 12% SDS-PAGE, 在 60 ku 左右处出现一条预期大小的蛋白条带, 而在 55 ku 处也出现一条蛋白条带(图 2), 重组蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中。Western-blotting 表明两条表达蛋白条带都带有 6 × His 标签, 经质谱进一步鉴定约 60 ku 左右的蛋白条带为引物酶蛋白条带(图 3)。

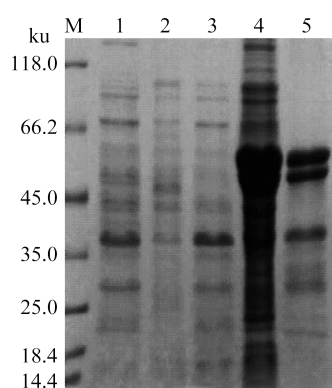


图2 pET32a-prim 重组蛋白表达产物的 SDS-PAGE(12%)

M. 蛋白分子量 marker; 1. 未诱导重组阳性菌超声上清; 2. 未诱导重组阳性菌超声沉淀; 3. 诱导后重组阳性菌超声上清; 4. 诱导后重组阳性菌超声沉淀; 5. 纯化后重组引物酶。

Fig.2 SDS-PAGE(12%) analysis of recombinant protein pET32a-prim

M. protein molecular marker; 1. supernatant of un-induced after sonication; 2. precipitate of un-induced after sonication; 3. supernatant of induced after sonication; 4. precipitate of induced after sonication; 5. purified recombinant primase.

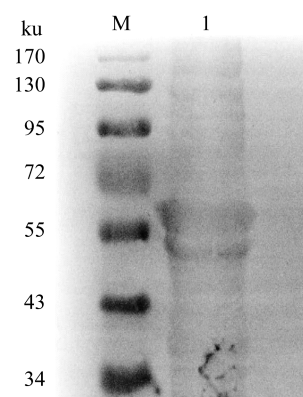


图3 Western-blotting 检测重组蛋白以 6 × His 标签抗体作为一抗

M. 蛋白分子量 marker; 1. 重组引物酶。

Fig.3 Recombinant protein detected by Western-blotting using His-tag antibody

M. protein molecular marker; 1. recombinant primase.

## 2.3 引物酶纯化和蛋白含量测定

重组表达蛋白经  $\text{Co}^{2+}$  琼脂糖凝胶纯化, 得到约 60 ku 的特异性目的蛋白条带。用 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定纯化引物酶蛋白含量为 0.714 mg/mL。

## 2.4 引物酶酶学活性测定

Pico-Green 荧光染料荧光强度稳定性检测  
设计 Pico-Green 荧光染料荧光强度稳定性确定最佳检测时间, 结果显示荧光染料随时间变化而变化, 在 30 min 后稳定性显著降低, 30 min 为检测最佳时间。(图 4)。

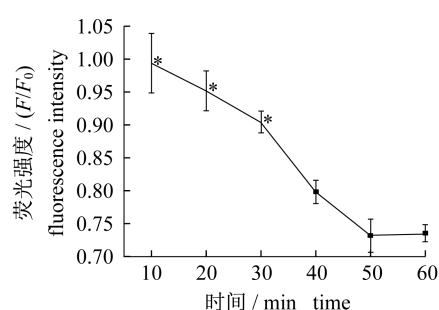


图4 时间变化与 Pico-Green 荧光强度的关系

\* \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig.4 The changes of time with Pico-Green fluorescence intensities

An asterisk mark ( \* ) indicates significant differences ( $P < 0.05$ ).

引物合成实验 在 30 °C 反应条件下, 每隔 10 min 在反应体系中加入 Pico-Green 染料进行检

测 RNA 引物合成的量。结果显示在 60 min 内,随着时间延长引物不断地从头合成,在 50 min 时合成量达到最大值然后趋于稳定。并且在前 30 min 荧光强度与引物合成的量呈线性关系(图 5)。

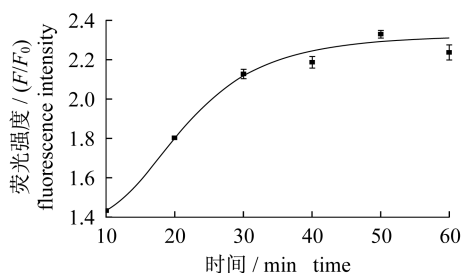


图 5 在 poly(d C) 存在下 AVNV 引物酶随时间变化从头合成引物的荧光强度分析

Fig. 5 Analysis of the fluorescence intensity of de novo primer synthesis by AVNV primase on the poly(d C)

底物特异性实验 以 poly(d C) 为模板,引物酶与 GTP、ATP、CTP 和 UTP 等不同底物进行催化反应。数据表明引物酶对 GTP 的催化活性最高,能比较特异的催化 GTP,并与其他三种三磷酸核苷酸存在显著差异(图 6)。

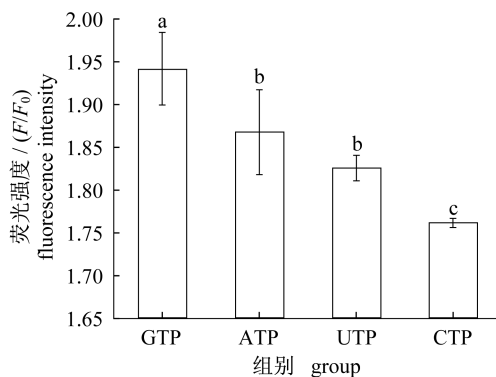


图 6 引物酶的底物特异性实验

Fig. 6 Specificity of the recombined primase for different substrates

不同浓度 EDTA 对引物酶活性的影响 在 0、1、5 和 10 mmol/L EDTA 4 组实验中,不加 EDTA 时,引物酶酶活性最强,随着 EDTA 浓度的增加,引物酶酶活性明显降低,EDTA 浓度为 10 mmol/L 时,抑制率达 12.20%,从而说明 EDTA 对 AVNV 引物酶具有强烈抑制作用(图 7)。

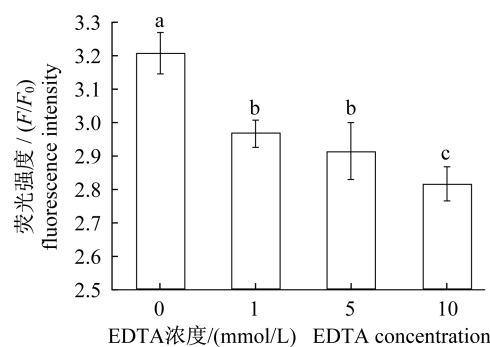


图 7 不同浓度 EDTA 对 AVNV 引物酶活性的影响

Fig. 7 The effect of EDTA on the activity of AVNV primase

不同金属离子对重组引物酶活性的影响

1 mmol/L  $Mn^{2+}$  就能抑制 AVNV 引物酶活性, $Zn^{2+}$  和  $Na^+$  可增强 AVNV 引物酶的活性,当  $Zn^{2+}$  只加入 0.1 mmol/L 时促进率就达 5.00%,而  $Na^+$  加入 5 mmol/L 时促进率才达到 3.00%,因此  $Zn^{2+}$  对 AVNV 引物酶活性具有提高作用,正常反应体系里包含  $K^+$  和  $Mg^{2+}$  (图 8)。

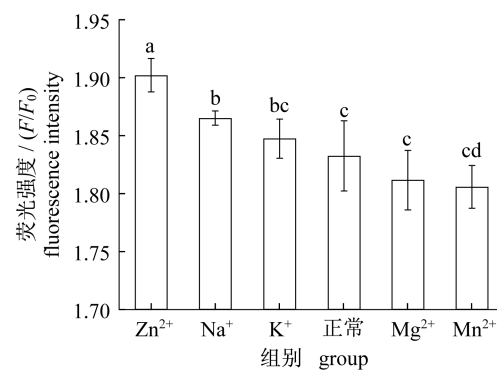


图 8 金属离子对重组引物酶活性的影响

Fig. 8 The effect of metal ion on the activity of AVNV primase

### 3 讨论

为了从分子学水平探究扇贝急性病毒性坏死病毒(AVNV)的感染机制实验从 AVNV 全基因组中扩增出编码 AVNV 引物酶的基因,通过原核表达获得了纯化复性的重组引物酶蛋白,并且恢复了该重组表达的引物酶的部分活性。在对重组表达产物的 SDS-PAGE 分析时观察到,重组表达的引物酶基因产生了两条分子量比较接近的蛋白条带,Western-blotting 和蛋白质谱表明两条带都是重组的引物酶蛋白,根据分子量推测 60 ku 左

右的蛋白为重组引物酶全基因表达的目的蛋白,而在 55 ku 左右蛋白可能是被剪切丢失部分多肽片段的引物酶,同时表达出的 35 ku 左右蛋白为大肠杆菌自身表达的非特异性蛋白。

报道的引物酶活性测定方法存在 3 种:(1)间接法测定引物酶活性,利用 Urea-PAGE 电泳胶和点印迹膜放射性自显影分析法检测引物酶活性,此方法能直观看到自显影出的阶梯状的合成引物,但需要放射性同位素标记的底物<sup>[15-16]</sup>;(2)利用 Thermally denaturing HPLC 技术检测合成短片段引物分析法,此方法比较繁琐且需要特定大型仪器<sup>[17]</sup>。(3)采用 Pico-Green 荧光染料检测合成短片段引物 RNA 分析法,Pico-Green 是一种能够特异性结合 ss-DNA、ds-DNA 和短片段 RNA 的荧光染料,此荧光染料的荧光数值只需荧光检测仪检测,且灵敏度高<sup>[18]</sup>。鉴于以上 3 种方法的特点并结合实验室条件和实验需求,以 Pico-Green 荧光染料检测法作为 AVNV 引物酶活性的研究方法。

本实验摸索 AVNV 引物酶实验体系,建立了能够进行 AVNV 引物酶活性分析的方法。实验中观察到 Pico-Green 荧光染料在 30 min 内荧光强度稳定性最好,因此 30 min 可作为进行 AVNV 引物酶底物特异性实验、EDTA 和金属离子对引物酶活性影响实验的最佳终止反应时间。引物合成实验分析表明在 1 h 反应时间内,随着时间的延长荧光强度数值上升的趋势表明引物合成的量不断增加,这与 Koepsell 等<sup>[18]</sup>在 *E. coli* 引物酶活性研究中引物的合成的结果相一致。由于 Pico-Green 荧光染料在前 30 min 内猝灭不明显,此阶段荧光强度数值能直观准确地反映引物合成的量。30 min 后荧光染料猝灭开始显著,表明此后荧光强度数值不能准确反映引物合成的量,并且明显低于实际引物合成的量。

相对于 ATP、CTP 和 UTP 这 3 种三磷酸核苷酸,重组引物酶在模板 poly(d C) 存在下,能够特异性催化底物 GTP。这与赵琪等<sup>[12]</sup>利用 Urea-PAGE 电泳胶和点印迹膜放射性自显影分析法进行 SARS 引物酶底物特异性的实验结果一致。

金属离子是引物酶维持空间结构稳定性和发挥酶活性重要辅助因子,Pan 等<sup>[19]</sup>认为  $Zn^{2+}$  可以与真核、原核或病毒的引物酶中的赖氨酸或组氨酸组成一种稳定的四面体结构,称为“锌指结构”

的特殊结构域,作为引物酶的活性中心发挥催化作用。在进行 EDTA 对 AVNV 引物酶活性影响中观察到 EDTA 对引物酶活性有明显抑制作用,10 mmol/L EDTA 的抑制率可达到 12.20%,表明二价金属离子是 AVNV 引物酶活性所必须的。向反应体系中加入  $Zn^{2+}$  和  $Na^+$  能促进 AVNV 引物酶活性,而  $Zn^{2+}$  促进作用显著,可能是形成的“锌指结构”对引物酶活性具有促进作用。 $Mn^{2+}$  对 AVNV 引物酶活性存在抑制作用,可能是“锌指结构”中的锌结合位点被  $Mn^{2+}$  竞争性结合,活性中心受到一定的破坏。在原本已经含有的  $K^+$  和  $Mg^{2+}$  的反应体系中额外这两种金属,是为了确定反应体系中的  $K^+$  和  $Mg^{2+}$  浓度是否为已经达到最佳,结果与预期相符。

目前,国内外关于贝类病毒功能基因的研究还鲜有相关文献报道,而这些功能基因的研究对于从分子水平上探究贝类病毒致病机理具有重要作用。贾志磊等<sup>[20]</sup>对 AVNV 致病相关的 dUTPase 基因进行克隆、表达、纯化及酶活性等研究,本实验开展并完成了 AVNV 引物酶基因的克隆、表达、纯化及酶活性研究,从而在分子水平上进一步加深了对 AVNV 致病机制的认识。今后随着更多 AVNV 功能基因发掘探究的开展,必将在更高层次水平上揭示 AVNV 的感染机制,也将为 AVNV 的防控提供必要的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学,2002,25(12): 23-26.
- [2] 王秀华,王崇明,李筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报,2002,26(2): 149-152.
- [3] 艾海新,王崇明,王秀华. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究[J]. 中国水产科学,2003,10(5):386-391.
- [4] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 病毒学报,2004,26(2):180-184.
- [5] 王崇明,王秀华,艾海新,等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究[J]. 病毒学报,2004,28(5): 547-553.
- [6] 任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.

- [ 7 ] Harrington C, Perrino F W. Initiation of RNA-primed DNA synthesis *in vitro* by DNA polymerase  $\alpha$ -primase [ J ]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23 ( 6 ): 1003 - 1009.
- [ 8 ] Timothy Y T, Frick D N, Richardson C C. Characterization of a novel DNA primase from the salmonella typhimurium bacteriophage SP6 [ J ]. *Biochemistry*, 2000, 39 ( 7 ): 1643 - 1654.
- [ 9 ] 欧阳石文. 真核生物引发酶及其作用 [ J ]. *生物技术通讯*, 2002, 13 ( 1 ): 47 - 49.
- [ 10 ] 李志铭. DNA 引物酶的结构与功能及其抑制剂的研究进展 [ J ]. *实用癌症杂志*, 2001, 16 ( 5 ): 553 - 555.
- [ 11 ] David N F, Richardson C C. DNA primase [ J ]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70 ( 1 ): 39 - 80.
- [ 12 ] 赵琪. 冠状病毒复制酶系结构与功能研究 [ D ]. 北京:清华大学, 2010.
- [ 13 ] 朱孝峰, 刘宗潮. DNA 引物酶的提取分离与引物合成活性的研究 [ J ]. *中山医科大学学报*, 1997, 18 ( 4 ): 279 - 281.
- [ 14 ] 蒋培余. DNA 引物酶及其在肿瘤增殖和治疗中的作用 [ J ]. *生物学通报*, 2004, 39 ( 7 ): 22 - 23.
- [ 15 ] Imbert I, Guillemot J C, Bourhis J M, *et al.* A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus [ J ]. *The EMBO Journal*, 2006, 25 ( 2 ): 4933 - 4942.
- [ 16 ] Beerens N, Selisko B, Ricagno S, *et al.* De novo initiation of RNA synthesis by the arterivirus RNA-dependent RNA polymerase [ J ]. *Journal of Virology*, 2007, 81 ( 16 ): 8384 - 8395.
- [ 17 ] Koepsell S, Bastola D, Hinrichs S H, *et al.* Thermally denaturing high-performance liquid chromatography analysis of primase activity [ J ]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 332 ( 2 ): 330 - 336.
- [ 18 ] Koepsell S A, Hanson S, Hinrichs S H, *et al.* Fluorometric assay for bacterial primase [ J ]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339 ( 2 ): 353 - 355.
- [ 19 ] Pan H, Wigley D B. Structure of the zinc-binding domain of *Bacillus stearothermophilus* DNA primase [ J ]. *Structure*, 2000, 8 ( 3 ): 231 - 239.
- [ 20 ] 贾志磊, 王崇明, 任伟成, 等. 急性病毒性坏死病毒 dUTPase 基因的克隆、表达及其产物的酶学活性分析 [ J ]. *水产学报*, 2011, 35 ( 9 ): 1320 - 1326.

## Expression and enzymatic activity analysis of primase from acute viral necrosis virus

QIAN Jing<sup>1,2</sup>, WANG Chongming<sup>2\*</sup>, PAN Luqing<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Acute viral necrosis virus (AVNV) was reported as one causative agent responsible for mass mortality of adult *Chlamys farreri*, which is widely cultured along northern China coast. To explore its pathogenesis at the molecular level, a gene was cloned which was predicted to encode AVNV primase based on the genomic sequence of AVNV completed by our laboratory. The gene encodes a protein of 350 aa with a predicted molecular mass of 60 ku. To obtain AVNV ORF 024, which probably encodes AVNV primase, a pair of specific primers was designed based on the genomic sequence of AVNV. Then this paper amplified the expected DNA by PCR, and used the total genomic DNA extracted from infected *C. farreri* tissues as template. Amplified PCR fragments were cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a(+). After that, the plasmid pET32a-prim was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain, and AVNV primase was expressed under IPTG induction. SDS-PAGE analysis showed that the two induced recombinant proteins' molecular mass was about 60 and 55 ku, the Western-blotting and mass spectrometry analysis proved that the expressed protein (60 ku) was the primase, while another expressed protein (55 ku) had some of the primase peptide fragments. Meanwhile, the experiments showed that Pico-Green (it was able to specifically bind to a random short segments of RNA) as the fluorescent dye which had a stable fluorescence intensity in 30 min. So the 30 min was the termination time for the enzymatic activity analysis of the recombined primase. In the presence of template of the poly(dC), the analysis of the enzymatic activity indicated that the recombinant primase could specifically catalyze the hydrolysis of GTP. The enzymatic activity of primase was enhanced by 0.1 mmol/L Zn<sup>2+</sup> but inhibited by 1 mmol/L Mn<sup>2+</sup> and EDTA.

**Key words:** primase; prokaryotic expression; Pico-Green fluorescent dye; enzymatic activity; poly(dC)

**Corresponding author:** WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn